探討結合誘變、小孢子培養與試管內篩選輔助育種平台之建立

農試所生技組 夏奇鋌 陳威臣　作物組 林子凱
鳳山分所 許秀惠 林楨祐

一、前言

在農業產業鏈中「品種」是製造及解決系統問題的同一源頭，但許多作物之新品種推出緩慢，原因與品種育成時間無法有效加速有關，這點也是傳統育種方法難以克服的瓶頸。成功的育種取決於育種材料的遺傳多樣性及有效的篩選方法，傳統育種透過雜交產生新的遺傳組合，達到創造變異的目的，但許多作物在人類長期選種下，遺傳多樣性早已大量流失，加上植物原生地的快速消失，多樣性種原的取得也愈發困難，如何在遺傳多樣性受限下持續創造新的變異，同時找出成本低、效率高的篩選方法，是育種人員必須努力的方向。以下介紹幾種常用於創造變異、加速育種流程及提高育種效率的輔助育種方法。

作　　者：夏奇鋌研究員
連絡電話：04-23317327

二、誘變育種簡介

利用物理或化學方法誘發染色體或DNA遺傳物質產生改變，稱之為人工誘變，其發生比例較自然產生的突變率高出許多，育種者利用人工誘變產生突變體，進而利用這些突變種原進行遺傳基因重組、擴大遺傳變異、創造新種質 (Predieri 2001)。誘變育種一般以性狀良好但仍具有少數缺點的現有品種作為人工誘變的材料，誘變後篩選所得之突變體大約70％可直接釋出成為新品種，其他30％則可作為育種材料之用。根據聯合國糧農組織和國際原子能機構之Mutant variety Database資料庫的統計，目前已有超過3275個突變栽培種登記，足證利用人工誘變技術是可行的育種工具 (FAO/IAEA mutant variety database 2018)。人工誘變率雖較自然突變率為高，但若想集眾多優良性狀於一身，亦即同時選拔多個基因於一個體，仍需準備數量相當大的選拔族群方有勝算，且隱性基因的選拔必須經由M_1自交後於分離的M_2世代中選拔，而基因的同質性確認，則需延至M_3或M_4才能完成，而一些受數量遺

傳控制的性狀則需歷經更多世代後才能開始選拔，以上這些困難是人工誘變同樣需要面對的問題。筆者以0.5%EMS誘變劑處理花椰菜F_1種子，播種後以苗齡4-6週之小苗進行黑腐病菌接種，圖一為接種3週後小苗的生長情形，可以看到大部分的誘變小苗與供試親呈現不同程度之病徵 (圖一A)，但亦有少數小苗未出現明顯病徵 (圖一B)，將進一步確認其抗病之利用性。

三、配子體培養技術簡介

由配子體分化而來的植株，其染色體數是孢子體的一半，也就是所謂的單倍體，單倍染色體經過自然或人為倍加後遂成為雙單倍體 (doubled haploid, DH)，DH的等位基因具有同質性，是進行遺傳研究及育種工作的最佳材料。DH可經由生體內 (*In vitro*) 或生體外 (*In vitro*) 方法誘導而得。*In vitro*獲得DH的途徑包括經由孤雌生殖、假性受精、遠源雜交等方式，但其產生有侷限性且發生率偏低；*In vitro* 獲得DH的方法，主要藉由培養配子體來達成，這種再生的途徑稱之為gametophytic pathway 或gametic embryogenesis，一般可藉由花藥培養、小孢子 (未成熟之花粉) 培養、子房培養或胚珠培養而得。

異交作物之商業品種以一代雜交品種 (F_1) 最為普遍，F_1具有雜種優勢強、整齊度高且自行留種後植株優良性狀難以保持等特性，成為經濟規模栽培與種苗商業化生產共同的最佳選擇。在生產F_1的過程中，首先必須純化親本之遺傳背景，也就是所謂的自交系培育。自交系一般需經6-8世代自交方能育成，若作物本身具有自交不親和性或自交弱勢等障礙，則培育自交系所需的人力與時間成本就更加提高。小孢子或花藥培養可於當代獲得DH，篩選所得之DH可直接成為自交作物的純系品種，或是作為異交作物生產F_1所需之親本，因此經由 *In vitro* 配子體培養獲得DH植株不僅可縮短育種年限，且因DH具有整齊度及穩定度高的特性，育種流程中的選拔效率得以提高 (Forster and Thomas 2005)。

圖一、花椰菜種子經0.5% EMS處理後以苗齡4-6週之小苗接種黑腐病菌，(A) 3週後之生長情形，(B)無明顯病徵之小苗。

四、試管內篩選簡介

Larkin and Scowcroft (1981) 首先提出體細胞變異 (somaclonal variation) 的現象，指的是在組織培養過中所產生的各種外觀及遺傳的改變。這個發現源起於無性繁殖作物在經由組織培養大量繁殖的過程中，理論上應該得到完全一致的分生苗 (clone) ，事實上在相同或不同的培養條件下，卻有機會觀察到一些與原植株相異的特性，持續將這些變異加以分離培養後，可以得到具有新特性的變異株。這些因為試管內培養而產生的新特性，在出瓶種植後有些可以繼續保持，有些則在持續種植後恢復正常，後者是所謂的表觀遺傳 (epigenetic) 較不具利用價值。組織培養系統中的體細胞變異從何而來並無定論，一般認為組織培養本身可能扮演著誘變系統的功能，因為培植體從繼代時所受的切割傷、培養基中的營養成分、生長調節劑、糖濃度、滲透壓、容器內的空氣組成以及濕度等各種因子，皆可能對培植體造成不同程度之逆境，這些逆境因子影響了正在進行分裂、分化及再生的細胞，導致大如細胞染色體組數目改變，小至於細胞基因分子層次改變，如轉位子 (transposable element) 活化、DNA序列變化以及DNA甲基化等，最終造成植物體在外觀上或生理上的改變而為人們所覺察。利用試管內篩選於輔助育種之先決條件，以及抗、耐病篩選劑之類型及其應用可參考夏等 (2014) 發表，在此不再贅述。

五、結合誘變、小孢子培養與試管內篩選之輔助育種平台

人工誘變是創造遺傳變異的一個有效手段，其在育種上的成效有目共睹 (Predieri 2001) ，但無論是物理或化學誘變，一個配合良好的生物系統是成功的先決條件，例如體積小且生長勢強的種子就是相當優良的誘變材料；但對於以無性繁殖為主的園藝作物而言，組織培養系統中之生長點、芽體、根段、小孢子、癒合組織或是懸浮細胞則是取代種子作為誘變材料的選項；在配合誘變處理方面，組織培養環境的可控性亦較田間處理為優，不僅可節省大量的空間且可精確調控施用的條件，誘變效率相對提高，其中利用小孢子培養系統進行誘變具有的獨特優點如下，一為當基因發生突變時， DH可立即將其固定並遺傳至後裔，等於提早得到M_2世代，隱性基因突變得以在當代選拔，加速了突變體的篩選；二為一般誘變獲得之M_1其單一基因外表型顯隱性之分離比為3:1，而小孢子培養之M_1其性狀分離比則為1:1，後者M_2所需族群數量可大幅降低，在相同族群大小的試驗中，選獲突變體的效率可大幅提高。除上述優勢外，利用小孢子作為誘變材料還具備有數量龐大及產生嵌合體機率較小之優點。筆者以花椰菜DH株系之小孢子進行UV誘變，可以看到UV的短暫處理對小孢子胚分化產生不良影響 (圖二)，由小孢子胚發育而來之突變體其遺傳種質與供體親之間可視為近

同源系 (isogenic line)，是進行表型體、基因體及分子標誌研究的優良材料。

小孢子培養除作為獲得DH植株應用外，同時也是配合試管內篩選之絕佳材料，小孢子誘導胚分化的過程從單細胞開始，數量龐大的小孢子加上胚分化的高度同步特性，讓小孢子培養系統成為進行誘變結合篩選的最佳模式系統。此外，試管內篩選可以讓田間篩選提前至胚或小苗階段，除節省時間與篩選成本外，並可降低田間試驗因環境變異所造成外表型觀測值的偏差。誘變系統配合試管內篩選系統同時運作，突變體的篩選效率將可大幅提高。上述模式最為人所熟知的例子為油菜種子之脂肪酸成分及比例的改進，過程中首先以油菜種子進行誘變，再以小孢子培養得到3000個胚，分別切取每一個胚之部分子葉進行油酸成分分析（子葉之含油成分及其比例與種子相同），再根據篩選結果將獲選之胚系培養長大，經由此法將linolenic acid 從原來之10%降至3%，而oleic acid從60%提高至85%，與傳統育種必須等待種子採收後再進行油酸成分分析的選拔模式相比，在時間效率上達到倍數提升 (Kott 1996)。此外，抗殺草劑油菜選拔也是結合誘變與小孢子培養的成功複合模式，油菜小孢子於分離後48 小時內以gamma ray或化學誘變劑如NaN_3、EMS處理，將由小孢子分化而來之胚於子葉期胚階段培養於含有殺草劑成分chlorsulfuron或gyphosate的培養基中，由於殺草劑成分會抑制植物光合作用的進行，因此在光照培養下呈現綠色之胚體，即為具有抗殺草劑特性之突變體。推測其機制為誘變讓基因產生點突變，導致植物體對於殺草劑成分的吸收、代謝或轉運產生不同的反應，因而改變其對殺草劑的耐受能力，再經由含有殺草劑之培養基將突變體篩出 (Polsoni *et al*. 1988; Swanson *et al*. 1988)。另一個結合小孢子培養、誘變及試管內篩選技術的例子為大白菜抗細菌軟腐病 (*Erwinia carotovora*) 的篩選，大白菜之小孢子以UV進行誘變處理，將所獲得之6657個胚培養於含有不同濃度細菌軟腐病濾液 (culture filtrate) 的培養基中進行篩選，共獲得250個存活胚，這些株系在出瓶後進

圖二、花椰菜DH系之小孢子以UV誘變處理不同時間後其小孢子胚分化之情形。(A) 對照組：UV- 0秒處理，(B) UV- 10秒處理；(C) UV- 20秒處理。

行軟腐病接種，再次測試其抗病性，結果其中3 個株系之抗病性呈現顯著增加 (Zhang and Takahata 1999)。

六、展望

台灣花椰菜種苗產業因擁有耐熱之早、中生品種，在熱帶、亞熱帶地區具有競爭力，但這些品種在遇短暫低溫時易有抽苔現象及不抗黑腐病之缺點。農試所生技組的組織培養研究室近年來建立有十字花科甘藍類蔬菜小孢子培養技術，且研究室過去在懸浮細胞培養、試管內多倍體誘導及試管內二次代謝物的誘導與篩選方面，亦累積有相當之經驗，具備有整合小孢子培養、誘變及試管內篩選技術的執行能力，同時結合生技、育種及植病研究團隊，針對花椰菜的產業缺口進行研究，希望藉由此一輔助育種平台的建立 (圖一及二)，能夠提升十字花科作物的育種能量，達到創造新種質、縮短育種時間及提高育種效率之目的。

七、參考文獻

夏奇鈮、陳威臣、曹進義。2014。利用試管內培養（in vitro）輔助育種–抗耐病篩選之探討。農業試驗所技術服務季刊 100:17-21。

FAO/IAEA mutant variety database 2018。https://mvd.iaea.org

Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed Rev. 25: 57-88.

Kott, L. 1996. Production of mutants using the rapeseed doubled haploid system. In: Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. IAEA/FAO Proceedings of an International Symposium on the use of induced mutations and molecular techniques for crop improvement. Vienne, Austria. pp. 505-515.

Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

Polsoni, L., L. S. Kott, and W. D. Beversdorf. 1988. Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. Can. J. Bot. 66: 1681-1685.

Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64: 185-210.

Swanson, E. B., M. P. Coumans, G. L. Brown, J. D. Patel, and W. D. Beversdorf. 1988. The characterization of herbicide tolerant plants in Brassica napus L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. Plant Cell Rep. 7: 83-87.

Zhang, F. and Y. Takahata. 1999. Microspore mutagenesis and *in vitro* selection for resistance to soft rot disease in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. pekinensis). Breed Sci. 49: 161-166.